

Aus dem Institut für Veterinärhygiene der
Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Hess)

**QUANTITATIVER SALMONELLENNACHWEIS IN
ABWASSERREINIGUNGSANLAGEN**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
RUEDI MAIER
Tierarzt von Winterthur

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. E. Hess, Referent
Prof. Dr. H. U. Bertschinger, Korreferent

Zürich 1982

Druck: Ruedi Gysin AG, Zürich



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Veterinärhygiene der
Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Hess)

**QUANTITATIVER SALMONELLENNACHWEIS IN
ABWASSERREINIGUNGSANLAGEN**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
RUEDI MAIER
Tierarzt von Winterthur

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Dr. h. c. E. Hess, Referent
Prof. Dr. H. U. Bertschinger, Korreferent

Zürich 1982

Druck: Ruedi Gysin AG, Zürich



Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Untersuchungsmaterial	5
3.	Kulturmedien und Reagenzien	7
4.	Bakteriologische Untersuchungsmethoden	10
4.1.	Der Nachweis von aeroben Keimen und Enterobakteriazeen	10
4.2.	Die Technik des quantitativen Salmonellennachweises	12
5.	Resultate	32
5.1.	Klärschlamm	32
5.2.	Abwasser	40
5.3.	Luft	43
6.	Diskussion	44
6.1.	Kommentar zur Salmonellen-Nachweismethode	44
6.2.	Besprechung der Ergebnisse der Schlammuntersuchungen	46
6.3.	Die hygienische Qualität des Abwassers und der Luft in den Kläranlagen	49
7.	Zusammenfassung	52
8.	Literatur	53
9.	Anhang: Die Berechnung des mittleren Keimgehaltes beim Anreicherungsverfahren	57

1. Einleitung

Vorläufer der Kanalisation waren in Zürich die Ehgräben. Es waren dies zirka ein Meter breite, gepflasterte und mit Stroh ausgelegte Gässchen zwischen den Hinterfronten der Häuser. Die Aborte ragten als Erker in diese Gässchen hinein, und die Fäkalien fielen den Hausmauern entlang hinunter - oft an Schlafzimmer- und Küchenfenstern vorbei; Haus- und Küchenabfälle warf man ganz einfach aus den rückwärtigen Fenstern. Im Ehgraben blieben die Abfälle liegen, dienten einem Heer von Ratten als Nahrung und verbreiteten einen abscheulichen Gestank. Ein Teil der flüssigen Abfallstoffe fand seinen Weg dem Graben entlang in die Limmat. Von Zeit zu Zeit wurden die Gräben ausgeräumt und wieder mit frischem Stroh belegt. In den Jahren 1867 bis 1870 wurden diese misslichen Zustände nach Pariser Vorbild durch ein System von Abtrittkübeln mit Ablauf (tinette filtrante) ersetzt.

Brentano (4), dem wir diese historischen Angaben verdanken, berichtet, dass man damals keine vollständige Schwemmkanalisation einrichtete, weil man der Landwirtschaft die wertvollsten Stoffe erhalten wollte, die Limmat nicht zu stark verunreinigen durfte und Wasserklosetts nicht vorzuschreiben wagte. Wasserklosetts wären als Geruchsabschluss zwischen Kanalisation und Hausinnerem unerlässlich gewesen.

Die Abtrittkübel wurden regelmässig eingesammelt und ihr Inhalt direkt oder nach Zwischenlagerung in grossen Gruben

an die Landwirte abgegeben. Der flüssige Ueberlauf der Kübel wurde in einer Kanalisation gesammelt und in die Limmat eingeleitet. Beim Ausbau dieses Entwässerungsnetzes berücksichtigte man seine Eignung für die später einzuführende Schwemmkanalisation.

1917 kam Roth (27) in einem Gutachten aufgrund von bakteriologischen Untersuchungen der Limmat zu diesem Schluss: "Die Notwendigkeit der Erstellung einer modernen Reinigungsanlage zwischen Kanalisation und Vorfluter ist nicht zu bezweifeln, erst recht dann nicht, wenn die erwähnten Kübeleinrichtungen einmal eliminiert werden." Dieser und anderen Gewässerschutz-Expertisen ist es zu verdanken, dass 1923 bis 1926 gleichzeitig mit der Einführung der Schwemmkanalisation in Zürich die Kläranlage "Werdhölzli" gebaut wurde.

Schon 1931 musste die Anlage durch Vervierfachung des Klärbeckenvolumens an die unerwartet rasch gestiegene Zahl der angeschlossenen Einwohner angepasst werden. Auch die ausschliesslich mechanische Reinigung des Abwassers mit Rechen, Sandfang und Absetzbecken erwies sich bald als unzulänglich. Schon gegen Ende der Dreissigerjahre zwang das massenhafte Auftreten von *Sphaerotilus natans* in der unterdessen gestauten Limmat dazu, diesem unästhetischen Zustand entgegenzuwirken. Durch eine biologische Reinigungsstufe musste nun auch die Konzentration der gelösten organischen Substanzen im eingeleiteten Abwasser reduziert werden.

Das Beispiel der Stadt Zürich zeigt, wie man die Gewässerschutzprobleme, welche mit der Zunahme der Bevölkerung und der Verbesserung der Städtehygiene ständig grösser wurden, Schritt für Schritt löste. Wenn es um den Schutz der Oberflächengewässer ging, scheute der Souverän auch andernorts keine Kosten. Diesem Interesse der Öffentlichkeit am Gewässerschutz verdanken wir den heutigen Stand der Abwasserreinigung.

Mit der ständigen Ausweitung und Intensivierung der Abwasserreinigung fällt immer mehr Klärschlamm an. Dieser Klärschlamm stellt vom Standpunkt des Gewässerschutzes gesehen nur ein Abfallprodukt dar, dessen es sich zu entledigen gilt mit der einzigen Auflage, dass es nicht wieder ins Oberflächen- oder Grundwasser gelangen soll.

Sinnvoll und zudem kostengünstig ist auch heute noch die Verwertung dieser Abfallstoffe als landwirtschaftliche Dünger. Um rezirkulierfähig zu sein, muss Klärschlamm aber allen Anforderungen genügen, die an einen Dünger gestellt werden. Als Gefahren einer unkontrollierten Schlammverwertung sind insbesondere erkannt das Akkumulieren von Schwermetallen in den Böden und ihre Einschleusung in die Nahrungskette sowie das Schliessen von Infektionszyklen. Das Schwermetallproblem kann wohl nur gelöst werden, indem man diese Schadstoffe überhaupt vom Abwasser fernhält. Bei der Bekämpfung der belebten Risikofaktoren hingegen liegt gerade in der zentralen Sammlung der Abwässer und in der Kon-

zentrierung der Schädlinge im Schlamm ein eminenter strategischer Vorteil.

Die Entsorgung der Kläranlagen durch die Landwirtschaft wird auf die Dauer nur funktionieren, wenn sich die Gewässerschutzseite den Forderungen von Düngerlehre, Toxikologie und Hygiene nicht verschliesst. Rechtsgrundlage ist dabei die am 1. Mai 1981 in Kraft getretene Klärschlammverordnung (1). Sie schreibt in Art. 3 vor, dass Klärschlamm zum Düngen von Futter- oder Gemüseflächen nur abgegeben werden darf, wenn er hygienisiert ist.

Es geht heute darum, die vom Gesetz vorgeschriebene Klärschlamm-Hygienisierung zu verwirklichen. In dieser Situation verfolgt unsere Arbeit drei Ziele:

1. Das Aufzeigen der Salmonellenbelastung von unhygienisiert an die Landwirtschaft abgegebenen Schlämmen soll zur zügigen Lösung der Probleme motivieren.
2. Das Erfassen von Rohabwasser, gereinigtem Abwasser und Luft als Rekontaminationsquellen soll zur Vermeidung von groben Fehlern beim Hygienisieren und Stapeln von Schlamm beitragen.
3. Die Erarbeitung von exakten Unterlagen soll die Diskussion um den Stellenwert der Abwasserreinigung innerhalb der gesamten Salmonellen-Epidemiologie sachlichen helfen.

2. Untersuchungsmaterial

Klärschlamm

370 Klärschlammproben wurden im Laufe des Jahres 1980 in 207 verschiedenen Anlagen erhoben. Bei der Probenahme wurde Wert darauf gelegt, Schlamm zu erhalten, wie er an die Landwirte abgegeben wurde (Abgabeschlamm). Wenn möglich wurden die Proben anlässlich einer Schlammabgabe direkt am Galgen gezogen. Wo Umwälzeinrichtungen und Entnahmestutzen vorhanden waren, wurde ausnahmsweise auch einmal eine Mischprobe aus dem Stapelraum entnommen. Die Proben von knapp einem Liter Volumen wurden in sterilen Gläsern aufgefangen und noch am gleichen, respektive nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ am nächsten Tag verarbeitet.

Rohabwasser

Im Herbst 1979 wurden von 29 grösseren Kläranlagen im Kanton Zürich je 2,5 Liter Rohabwasser untersucht. Die Proben wurden aus dem Kläranlagen-Zulauf geschöpft und spätestens nach zwei Stunden untersucht.

Gereinigtes Abwasser

Während des ersten Halbjahres 1980 erhoben wir in 140 Kläranlagen 150 Proben von gereinigtem Abwasser. In Kläranlagen, in denen gereinigtes Abwasser als Brauchwasser verwendet wurde, entnahmen wir die Proben nach längerem Auslaufen-

lassen den Brauchwasserleitungen. Bei den übrigen Anlagen schöpften wir das Probenmaterial aus dem Ueberlauf der Nachklärbecken. Die Proben umfassten einen Liter und wurden am Erhebungstag verarbeitet.

Luft

Umständlicher gestaltete sich die Probenerhebung zur bakteriologischen Untersuchung der Luft innerhalb des Kläranlagenareals. Unser Interesse galt nicht den in der Luft schwebenden Bakterien sondern allein den sedimentierenden. Zum Auffangen dieser Keime dienten auf ein Meter hohe Eisenständer plazierte sterilisierte Glasschalen, deren Boden mit gepuffertem Peptonwasser bedeckt war. Die Schalen hatten 5 cm hohe, senkrechte Wände, so dass auch grössere Niederschlagsmengen aufgefangen werden konnten und die exponierte Oberfläche konstant 64 cm^2 betrug.

Je Versuch wurden 10 Schalen über Nacht exponiert. Nach Versuchsende wurde ihr Inhalt mit sterilen Schläuchen abgehebert und sofort zur Untersuchung ins Labor gefahren. Diese bakteriologischen Erhebungen wurden in den Wintern 1978/79 und 1979/80 durchgeführt und nur ausgewertet, wenn die Temperatur während der Expositionsdauer nie über $+5^{\circ} \text{C}$ angestiegen war. So konnte eine Keimvermehrung im Exponat mehr oder weniger ausgeschlossen werden. In fünf verschiedenen Kläranlagen haben wir je fünf derartige Bestimmungen durchgeführt.

3. Kulturmedien und Reagenzien

Nährboden zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl

Standard Methods Agar (BBL 11638). Abkürzung: PC.

Nährboden zur Bestimmung der Enterobakteriazeenzahl

Violet Red Bile Agar (BBL 11887). Dem Trockennährboden wurden pro Liter Wasser 10 g Glukose beigemischt, um auch die Laktose-negativen Enterobakteriazeen zu erfassen (24). Abkürzung: VRB+G.

Anreicherungsmedium für Enterobakteriazeen

Enterobacteriaceen-Anreicherungsbouillon nach Mossel (Merck 5393). Abkürzung: Mossel-Bouillon.

Voranreicherungsmedium für Salmonellen

Gepuffertes Peptonwasser nach van Schothorst und van Leusden (31), modifiziert, um pH $7,1 \pm 0,1$ zu erzielen.

KH_2PO_4		1,40
Na_2HPO_4	(kristallwasserfrei)	3,60
NaCl		5,00
Pepton	(Difco 0118-01)	10,00
Aq. demin.		1'000

Die Substanzen wurden in der angegebenen Reihenfolge auf dem Magnetrührer im kalten Wasser gelöst und dann im Autoklaven sterilisiert. Abkürzung: BPW.

Anreicherungsmedium für Salmonellen

Natrium-Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kauffmann (20),
modifiziert.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100,0
Trypticase Soy Broth (BBL 11768)	52,5
CaCO_3	100,0
Rindergalle	200,0
Brillantgrünlösung 0,5 %	10,0
Malachitgrünlösung 0,4 %	48,0
Jodjodkalilösung 12 : 15 : 100	40,5
Aq. demin.	1'950

Das Natriumthiosulfat und die Bouillon wurden einzeln in 200 respektive 1'750 ml Wasser gelöst. Diese beiden Lösungen sowie das Kreidemehl und die Galle wurden individuell sterilisiert und dann zusammengemischt. Schliesslich wurden die Farblösungen langsam zugegeben. Die Mischung war im Dunkeln bei Zimmertemperatur haltbar. Die Jodjodkalilösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 : 500 zugegeben.

Selektivagar zur Isolierung der Salmonellen

Brilliant Green Agar (Difco 0285-01). Der im Wasser aufgeschwemmte Trockennährboden wurde entgegen den Vorschriften des Herstellers nicht autoklaviert, sondern genau 30 Minuten im strömenden Dampf gelöst und pasteurisiert (Schonung

des hitzeempfindlichen Brillantgrüns). Die frisch gegossenen Platten wurden über Nacht bei 37° C getrocknet, bei +4° C aufbewahrt und vor Gebrauch nochmals getrocknet, wobei sich Temperatur und Dauer nach Qualität und Alter der jeweiligen Charge richteten (siehe Seite 18). Abkürzung: BGA.

Agar für die Reinkultur der Salmonellen

Brilliant Green Agar (modified) (Oxoid CM 329).

Immunseren

Im Institut nach Roschka (26) hergestellte Kaninchenserum gegen die Salmonellen-O-Antigene 1, 4, 5, 12, 27 (Gruppe B), 6, 7 (Gruppe C₁), 6, 8 (Gruppe C₂), 1, 9, 12 (Gruppe D) und 3, 10, 15 (Gruppe E).

Oxidase-Reagens

N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin-dihydrochlorid (Fluka 87890). 1 %-Lösung.

Kleine bunte Reihe

Mannit mit Durhamröhrchen

o-Nitrophenol- β -D-galaktopyranosid (ONPG)

Urea

Sulfide-Indole-Motility (SIM)

KCN

Lysin

4. Bakteriologische Untersuchungsmethoden

Die Proben von Klärschlamm und gereinigtem Abwasser wurden quantitativ auf aerobe Keime, Enterobakteriazeen und Salmonellen untersucht. Unbehandeltes Abwasser wurde auf aerobe Keime und Enterobakteriazeen quantitativ, auf Salmonellen hingegen nur qualitativ geprüft; denn im Gegensatz zur Zahl der aeroben Keime und Enterobakteriazeen schwankt die Menge der Salmonellen im Rohabwasser so enorm, dass aus Einzelproben keinerlei Informationen über die effektive Fracht gewonnen werden können. Bei der Bestimmung der aus der Luft sedimentierenden Keime haben wir wegen der geringen Keimzahlen ganz auf den Salmonellennachweis verzichtet und nur die aeroben Keime und die Enterobakteriazeen quantitativ erfasst.

4.1. Der Nachweis von aeroben Keimen und Enterobakteriazeen

Wir benutzten die von Breer und Ruosch (3) beschriebene Tropfmethode zum quantitativen Nachweis der Enterobakteriazeen. Analog haben wir die aeroben Keime in Tropfkulturen auf PC-Agar nach 40-48 Stunden aerober Bebrütung bei 30°C ausgezählt (Gesamtkeimzahl).

Bei der Untersuchung von Auffangflüssigkeit für Luftkeime und bei anderem Untersuchungsmaterial, das nur wenig Enterobakteriazeen enthielt, wurden Kombinationen von Tropfmethode und Anreicherungsverfahren verwendet. Eine dieser

Kombinationen hat sich zur quantitativen Erfassung der Enterobakteriazeen im Bereich zwischen 10^{-1} und 10^{+3} Keimen pro Gramm bewährt. Dieses Intervall ist für die Beurteilung von hygienisierten Schlämmen von ausschlaggebender Bedeutung. Die Methode sei deshalb hier ausführlich beschrieben:

Aus der Originalprobe wurden nach gründlichem Mischen 20 g entnommen und mit 100 g Mossel-Bouillon aufgeschwemmt und homogenisiert. Von dieser 1:6-Verdünnung wurden je 20ml als Anreicherungskultur in vier Röhrchen pipettiert und zur direkten Koloniezählung 24 Tropfen à 50 μ l auf drei VRB+G-Platten verteilt. Die Anreicherungskulturen wurden 24 Stunden bei 30°C bebrütet und dann auf VRB+G umgezüchtet. Alle Platten wurden 40–48 Stunden bei 30°C unter anaeroben Verhältnissen bebrütet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Tabelle 1.

Tabelle 1: Mittelwert der Keimzahlen pro Gramm Probenmaterial beim kombinierten Enterobakteriazeen-Nachweis

Anreicherungen* positiv : negativ	Zahl der Kolonien in den 24 Tropfen**		
	keine	1	2 und mehr
0 : 4	negativ	0,07/g	Ergebnis unwahrscheinlich, Versuch wiederholen !
1 : 3	0,1/g	0,2/g	
2 : 2	0,2/g	0,4/g	
3 : 1	0,5/g	0,7/g	
4 : 0	5,5/g	10 /g	5 x (Anzahl Kolonien + 1)

* Inokulum = 4 x 3,3 g

** Inokulum = 1 x 0,2 g

4.2. Die Technik des quantitativen Salmonellennachweises

4.2.1. Vorarbeiten

Salmonellen sind aus kontaminiertem Material einigermaßen zuverlässig nur über ein selektives Anreicherungsverfahren nachweisbar. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse ist aber erst sinnvoll, wenn es gelingt, selbst minimale Keimzahlen regelmässig nachzuweisen. Infolge der geringen Spezifität der gegenüber den Begleitkeimen wachstumshemmenden Mittel ist die selektive Anreicherung grundsätzlich ein Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und Selektionsvermögen. Seine Inkonvenienz wird dadurch gemildert, dass — wie von den meisten Autoren empfohlen — verschieden stark hemmende Selektivplatten parallel eingesetzt werden. Mit der von Byrne et al. (5) eingeführten Voranreicherungstechnik ist nun aber die Möglichkeit gegeben, den ersten Schritt des Nachweisverfahrens, die Voranreicherung, in bezug auf methodische Empfindlichkeit und die folgenden Passagen bezüglich Selektivität zu optimieren. Ausgeschöpft kann dieser Vorteil allerdings erst werden, wenn, wie es bei unserer Problemstellung der Fall war, keine Randbedingungen betreffend die Untersuchungsdauer berücksichtigt werden müssen.

Aufgrund dieser Ueberlegungen wurde die an unserem Institut gängige Salmonellen-Nachweismethode modifiziert, um eine zahlenmässige Auswertung der Resultate zu ermöglichen. Im folgenden seien die Ergebnisse von Einzeluntersuchungen und

die Konsequenzen, die wir daraus gezogen haben, summarisch vorgestellt.

Dabei ist zu betonen, dass alle Versuche mit Klärschlamm angestellt und dass keine Laborstämme eingesetzt wurden.

Voranreicherungen

In einem ersten Versuch mit drei verschiedenen Schlämmen wurden mit der Voranreicherungstechnik 60% mehr positive Einzelproben erzielt als mit direkter Anreicherung. Beim Nachweis von durch Sonneneinstrahlung und Austrocknung dezimierten und vermutlich subletal geschädigten Salmonellen gelang der Nachweis häufiger und eindeutiger, wenn die Voranreicherungsdauer von ursprünglich 24 Stunden auf das Doppelte ausgedehnt wurde. Eine zusätzliche Verlängerung der Bebrütungsdauer um einige Tage hatte dann keinen negativen Einfluss auf die Nachweisbarkeit, wenn die Bebrütungstemperatur von 37°C, wie üblich, auf schonendere 30°C reduziert wurde. Wir legten die Dauer der Voranreicherung auf 3±1 Tage fest, um trotz unregelmässigem Probeneingang einen regelmässigen Arbeitsfluss zu erreichen, ohne dass die Originalproben gelagert werden mussten. Wir hatten nämlich beobachtet, dass in vielen Schlämmen die Salmonellen auch bei Kühlschranktemperatur rasch abnehmen.

Umzüchten in die Anreicherung

Die Frage, ob die Umzüchtung von 1 ml Voranreicherung auf 9 ml Tetrathionat-Bouillon ebenso gute Resultate ergibt wie

das Uebertragen von 10 ml auf 90 ml, wurde wie folgt entschieden:

Wir bestimmten die Salmonellenkonzentration in mehreren vorbebrüteten Peptonwasser-Kulturen mit und ohne Voranreicherung. Ohne Voranreicherung wurden parallel Volumina von 9 und 99 ml Tetrathionat-Bouillon in gleicher Schichthöhe eingesetzt.

Es stellte sich heraus, dass der Salmonellennachweis aus den direkten Anreicherungen immer dann gelang, wenn sie mit mindestens einer über Voranreicherung nachweisbaren Einheit pro ml gestartet wurden. Der Erfolg der Anreicherungskultur war also nicht von der Anzahl der eingimpften Salmonellen abhängig sondern von ihrer Ausgangskonzentration. Dies ist die Begründung für die von d'Acoust und Maishment (?) gemachte Beobachtung, dass das Umzüchten von 1 ml ad 10 ml gleich gute Resultate bringt wie das Umzüchten von 10 ml ad 100 ml. Der durch die Einführung der ersten Version erzielte sparsame Materialverbrauch erlaubte uns, das im Institut wöchentlich aus den Grundsubstanzen hergestellte Anreicherungsmedium zu verwenden, das übrigens einem kommerziell erhältlichen Produkt wesentlich überlegen war.

Einfluss des Luftsauerstoffes

Ein Versuch, bei dem die auf BGA koloniebildenden Einheiten ausgezählt wurden, zeigte, dass die selektive Wirkung der Anreicherungskultur auch von der Höhe des Flüssigkeitszy-

linders und der Ausdehnung seiner Berührungsfläche mit der Luft abhängig ist. Die Resultate dieses Versuches sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Bestimmung der auf BGA koloniebildenden Einheiten (CFU) in Tetrathionat-Bouillon bei verschiedenen Abmessungen der Flüssigkeitssäule in den Kulturgefässen

Tetrathionat-Bouillon		CFU auf BGA (ml ⁻¹)		Verhältnis A : B
Höhe (cm)	Berührungsfläche mit Luft (cm ²)	Laktose- neg. (A)	Laktose- pos. (B)	
0,5	40	$1,2 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	1,1 : 1
10	2	$9,4 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^4$	260 : 1
10	0*	$5,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^4$	410 : 1

* mit einer Schicht von 1 cm Paraffin bedeckt

Wir interpretierten das Versuchsergebnis dahin, dass der für die Salmonellen aus der Verwertbarkeit des Tetrathionates als Wasserstoffakzeptor entstehende selektive Vorteil nur unter anaeroben Verhältnissen zum Tragen kommt, und reicherten seither nur noch in 10 cm hohen Säulen an. Ueberschichtungen mit Paraffin wurden nicht eingesetzt, da sie im Verhältnis zum Aufwand keinen entscheidenden zusätzlichen Vorteil versprachen.

Dauer der Anreicherung

Es ist schon seit 1916 bekannt, dass die Subkultur aus der Anreicherung auf die Selektivplatten nach 48 Stunden Bebrü-

tungszeit oft noch positive Resultate bringt, wenn der Salmonellennachweis nach 24 Stunden nicht gelungen war (28). Das Umgekehrte wird — meistens ohne Angabe der Gründe — ebenfalls berichtet. Bei uns traten falsch negative Resultate beim Umzüchten nach 48 Stunden nur dann auf, wenn Proteusbakterien die Selektivplatten überwucherten. Untersuchungen ergaben, dass Proteus in der Tetrathionat-Bouillon langsamer wächst als die Salmonellen und die stationäre Phase in der Regel erst nach drei Tagen erreicht. Somit war klar, dass mit der Dauer der Anreicherungskultur die Gefahr zunimmt, dass die Salmonellenkolonien auf den Selektivplatten hoffnungslos in den schwärmenden Proteuskeimen untergehen. Nachdem uns aber, wie später gezeigt wird, ein Nährboden zur Verfügung stand, der das Wachstum von Proteus zuverlässig unterdrückte, konnten wir auf die Subkultur nach 24 Stunden verzichten.

Bebrütungstemperatur

Seitdem einmal falsch negative Resultate darauf zurückgeführt werden mussten, dass die Temperatur im untersten Teil des Brutschrankes wesentlich über 43° C angestiegen war, wurden die Anreicherungsmedien in einem Wasserbad bebrütet. Anstelle eines Deckels für das Wasserbad benutzten wir auf der Wasseroberfläche schwimmende Plastikbälle. Damit verhinderten wir, dass Kondenswasser in den Spalt zwischen Kulturröhrchen und Verschlusskappe aufstieg, was eine Kontaminationsgefahr bedeutet hätte.

Isolierung

Vorausgesetzt, dass genügend Zeit zur Verfügung steht, lassen sich Salmonellen problemlos anreichern. Da zwangsläufig auch die Begleitflora, insbesondere Laktose-positive Enterobakteriazeen, Proteus und Pseudomonaden, mitangereichert wird, ist es entscheidend, dass die Selektivplatten die Koloniebildung der Begleitflora effizient drosseln.

Nachdem in unserem Institut nachgewiesen worden war, dass bei der Klärschlammuntersuchung ohne Nachteil auf den Desoxycholat-Zitrat-Laktose-Saccharose-Agar verzichtet werden kann (23), wurden noch BGA nach Kauffmann (21) und die nach Edel und Kampelmacher (11) modifizierte Version parallel verwendet. Beide Medien hatten ihre Vor- und Nachteile.

In einem Versuch, bei dem die beiden Nährböden nach der Tropfmethode beimpft wurden, wuchsen auf den BGA-Platten Laktose-negative und Laktose-positive Keime im Verhältnis 98:2, auf den modifizierten Platten aber im Verhältnis 71:29. Das Resultat zeigte, dass die Hemmwirkung des modifizierten Mediums auf Laktose-positive Keime gering ist. Unbrauchbar war das Medium aber, weil es Proteuskeime, die in jedem Schlamm vorkommen, ungenügend hemmte, so dass sie die Salmonellenkolonien oft schwärmend überwucherten.

Durch Zusatz von Sulfazetamid und Mandelsäure nach Watson und Walker (33) wurde der modifizierte BGA dem ursprünglichen Medium ebenbürtig aber nicht überlegen. Eine Verbesse-

rung bedeutete aber die von den genannten Autoren eingeführte Erhöhung der Bebrütungstemperatur für BGA-Platten auf 43° C. Wir hatten damit denselben Erfolg wie schon Spino (29). bei dem das Anheben der Bebrütungstemperatur auf 41,5° C "often resulted in an almost pure culture of *Salmonella* organisms."

Wenn das BGA-Medium nach Kauffmann bei der Zubereitung zu lange erhitzt wurde, sank der Hemmeffekt des Brillantgrüns; wurden aber die Nährböden bei Zimmertemperatur gelagert, stieg die Hemmstoffkonzentration an der Oberfläche an. Da sich beide Effekte gegenseitig kompensieren können, wurde ihnen lange nicht die nötige Aufmerksamkeit geschenkt.

Nachdem das Problem aber erkannt war, führte folgende Praxis zu reproduzierbar gutem Wachstum der Salmonellen, zur vollständigen Unterdrückung von *Proteus* und zu einem stark gehemmten Koloniebildungsvermögen bei den Laktose-positiven Enterobakteriazeen:

- sorgfältige Herstellung der Platten,
- Aufbewahrung im Kühlschrank,
- dosiertes Trocknen unmittelbar vor dem Gebrauch und
- konsequente Erfolgskontrolle.

Die Qualität der Platten liess sich am Wachstum Laktose-positiver Enterobakteriazeen zuverlässig beurteilen. Auf einer einwandfreien Platte bildeten diese Testkeime kleine, dunkelgrüne Kolonien. Waren die Kolonien hingegen gross und

von hellgrüner Färbung, dann mussten die Platten der betreffenden Charge vor Gebrauch besonders gut getrocknet werden.

Mit der wachsenden Erfahrung in der Handhabung und Beurteilung der BGA-Platten vor dem Gebrauch sank der Anteil der darauf wachsenden Laktose-positiven Keime. Es musste deshalb möglich sein, sie durch Verdünnen der Tetrathionat-Bouillon vor dem Ueberimpfen zum Verschwinden zu bringen. Sorgfältig tasteten wir uns an eine optimale Verdünnung heran. Beim Verdünnungsverhältnis von 1 : 60 wuchsen in der Regel noch über 100 Salmonellenkolonien und nur noch selten Laktose-positive Keime. So wurde die vielgerühmte Erfahrung beim Herauspicken von verdächtigen Kolonien überflüssig. Drei berufsfremde Personen erlernten das zuverlässige Anlegen von Salmonellen-Reinkulturen aus BGA-Platten auf Anhieb. Man musste nur noch gelegentlich die Salmonellenkolonien von denen der Pseudomonaden unterscheiden, was bei Tageslicht nicht schwierig ist.

Reinzüchtung

Modifizierte BGA-Platten wurden nicht mehr zur Selektivkultur eingesetzt, sie leisteten aber gute Dienste als Nährböden zur Reinkultivierung der Salmonellenstämme, wozu nicht zuletzt ihre ausgezeichnete Lagerfähigkeit beitrug. Das konsequente Reinzüchten der Salmonellen vor jeder weiteren Untersuchung drängte sich auf, weil oft verschiedene Typen dieselbe Platte bevölkerten. Von 296 Ausstrichen wurden versuchsweise je 4 Kolonien reingezüchtet. Auf 205 Platten

(69 %) gehörten alle 4 Stämme in die gleiche O-Gruppe, auf 67 Platten (26 %) fanden wir zwei O-Gruppen vertreten und auf 15 Platten (5 %) sogar drei. An ein speditives Arbeiten beim Agglutinieren war deshalb nur beim Verwenden von Reinkulturen zu denken. Auch der Oxidase-Test ergab erst bei Reinkulturen zuverlässige Resultate, da auf den Selektivplatten die Salmonellenkolonien oft mit noch unsichtbaren Pseudomonaden verunreinigt waren.

Bestätigungsverfahren

Wir beabsichtigten, die Methodik so zu verfeinern, dass die Salmonellen auf den Selektivplatten dominieren mussten. Ein Alles-oder-Nichts-Prinzip sollte soweit möglich das subjektive Ermessen und die Erfahrung des Untersuchers beim Auswählen von verdächtigen Kolonien sowie von Bestätigungsverfahren ersetzen. Die üblichen Bestätigungsreaktionen beschränkten wir auf die Objektträger-Agglutination eines einzigen Stammes und reservierten biochemische Untersuchungen für die seltenen Isolate, die mit den gängigen Seren nicht agglutinierten.

Kontrollen

Im Sinne einer externen Kontrolle liessen wir Stichproben der Isolate von der Schweizerischen Salmonellazentrale typisieren. Als interne Kontrolle führten wir eine sich an die Voranreicherung anschliessende zweite Passage in gepuffertem Peptonwasser ein. Diese Kontrollkulturen wurden im übrigen gleich weiterverarbeitet wie die Erstkulturen.

Die zahlenmässige Auswertung der Resultate

Standardmethode beim Auswerten der Ergebnisse von Mehrfachanreicherungen ist das von McCrary (22) inaugurierte Most-Probable-Number-(MPN)-Verfahren. Unsere Untersuchungen unterschieden sich methodisch sowie in der Zielsetzung von Untersuchungen, auf welche die MPN-Methode zugeschnitten ist. Zudem fanden wir in der Literatur gar keine MPN-Tabelle für das von uns gewählte Schema von sechsfach parallel untersuchten Zehnerstufen. Deshalb berechneten wir eigene Werte (Tabelle 3) und gingen dabei etwas andere Wege.

Die Wahrscheinlichkeit, mit der aus einer Gesamtprobe eine bestimmte Kombination von positiven und negativen Teilproben gezogen werden kann, ist eine Funktion der Keimzahl in der Gesamtprobe. Der Modus dieser Wahrscheinlichkeitsfunktion wird MPN genannt. Bei seiner Berechnung wird vorausgesetzt, dass die Gesamtprobe (unendlich) gross sei und die Keime darin zufällig verteilt seien.

Bei unseren Untersuchungen wurde das homogenisierte Probenmaterial sozusagen vollständig aufgebraucht. Wir berechneten deshalb Wahrscheinlichkeitsfunktionen nicht für Keimkonzentrationen in einem unendlich grossen Ausgangsvolumen sondern für die Anzahl Keime im effektiv untersuchten Probengut.

Da es unser Ziel war, die Daten einer grossen Zahl von Proben verschiedenster Herkunft zu sammeln und auszuwerten, benützten wir zur Schätzung der Salmonellenzahlen nicht die

Modi sondern die Mittelwerte der Wahrscheinlichkeitsfunktionen. Der Modus ist die Keimzahl, die am häufigsten eine bestimmte Kombination positiver und negativer Teilproben verursacht, und deshalb die beste Schätzung im Einzelfall. Bei Einbezug einer grossen Zahl von Stichproben ist er infolge der unsymmetrischen Verteilung der Wahrscheinlichkeiten eine - bei unserer Aufteilung der Proben etwa 20% - zu niedrige Schätzung für den Erwartungswert. Eine Anleitung zum Berechnen des Mittelwertes findet sich im Anhang.

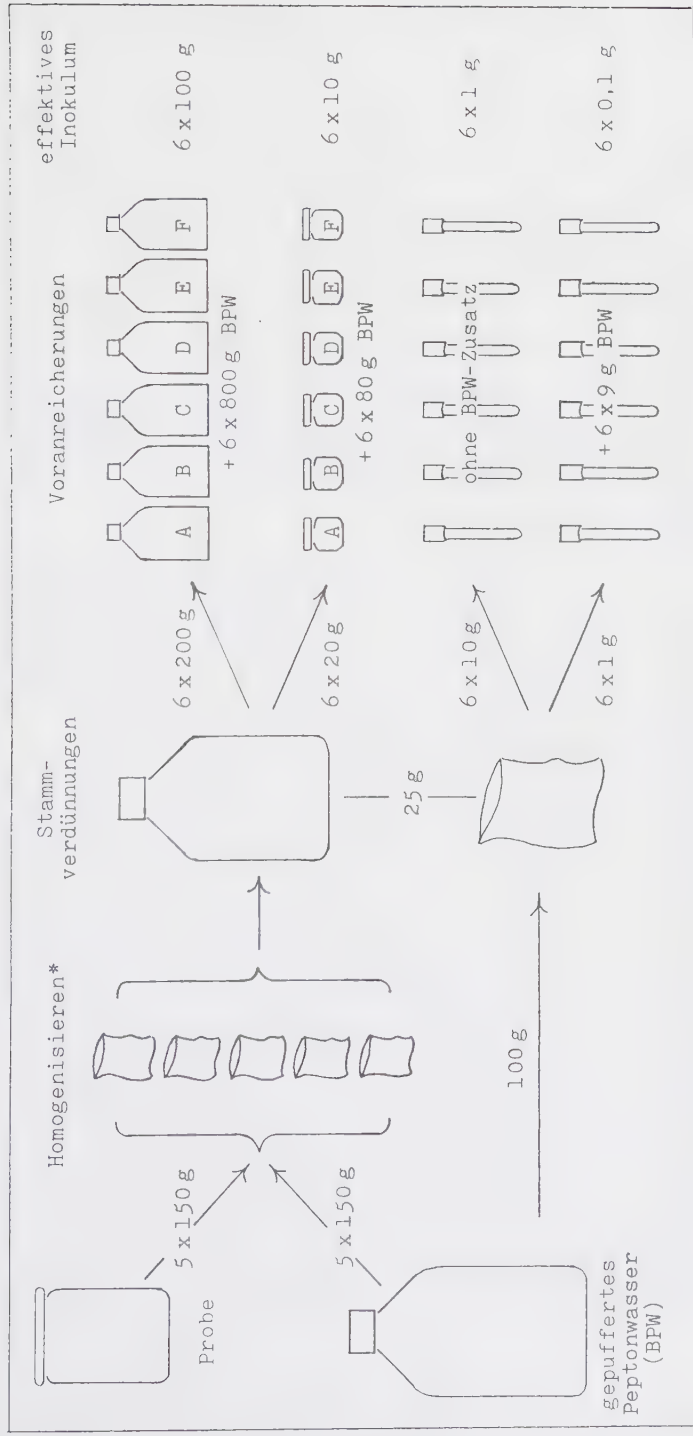
4.2.2. Die verwendete Methode

Homogenisieren und Portionieren des Probenmaterials

Die Proben wurden in 24 Einzelportionen (je 6 à 100, 10, 1 und 0,1 g) abgeteilt, wobei wie folgt vorgegangen wurde: Von der Originalprobe wurden fünfmal zirka 150 g im Verhältnis 1:1 mit Peptonwasser eingewogen und 1 Minute lang im Stomacher* homogenisiert. Die Homogenate wurden in eine sterile Flasche zusammengegossen und kräftig geschüttelt. Von dieser 1:2-Verdünnung wurden 6 mal 200 ml in Literflaschen umgegossen, die bereits 800 ml Peptonwasser enthielten, und 6 mal 20 ml in Konfitürengläser, die 80 ml Peptonwasser enthielten. Vom Ueberschuss wurden zirka 25 g im Verhältnis 1:4 mit Peptonwasser eingewogen und "gestoma-

* Stomacher Lab-Blender 400, A.J. Seward & Co, Bury St Edmunds, Suffolk

Abbildung 1: Das Einwiegen der Voranreicherungen



* Homogenisieren in Plastiksäcken mit dem Stomacher

chert". Von dieser 1:10-Verdünnung wurden 6 mal 10 ml in leere Röhrchen pipettiert und 6 mal 1 ml in Röhrchen, die 9 ml Peptonwasser enthielten. Der Rest dieses Homogenates wurde zum Bestimmen der Gesamtkeim- und Enterobakteriäsenz-zahl verwendet. In Abbildung 1 ist das beschriebene Prozedere schematisch dargestellt.

Das optimale Homogenisieren vor jedem Teilungsschritt ist *condicio sine qua non* jedes quantitativen Keimnachweises.

Voranreicherung

Die Peptonwasser-Mischungen wurden gründlich geschüttelt oder mit dem Vortex-Genie* intermittierend gewirbelt und dann bei einer Temperatur von 30°C 3 ± 1 Tage lang bebrütet.

Anreicherung und Kontrollkultur

Von jeder Voranreicherungskultur wurde nach der Bebrütung 1 ml zu 9 ml frisch gejojeter Tetrathionat-Bouillon in Röhrchen pipettiert. Zur Absicherung wurde gleichzeitig eine Kontrollkultur angesetzt, indem aus den Literflaschen 10 ml zu 90 ml Peptonwasser und aus den übrigen Voranreicherungen 1 ml zu 9 ml Peptonwasser gegeben wurde. Diese Kontrollkulturen wurden 4 Tage lang bei 30°C bebrütet und sonst gleich weiterverarbeitet wie die Voranreicherungskulturen. Die beimpften Tetrathionat-Röhrchen wurden 40-48 Stunden in einem Wasserbad von 43°C bebrütet.

*Vortex-Genie, Scientific Industries Inc., Springfield, Massachusetts

Isolierung der Salmonellen

Nach der Bebrütung wurden die Tetrathionat-Röhrchen mit dem Vortex-Genie gründlich gewirbelt; dann wurde von ihrem Inhalt eine Verdünnung von ungefähr 1 : 60 hergestellt, indem man 3 Tropfen mit 9 ml Peptonwasser vermischte. Von dieser Verdünnung wurde mit der Oese eine Spur in Form eines kurzen Impfstiches auf eine Drittelsplatte BGA übertragen. Nach dem Antrocknen wurden die Impfstiche in Querrichtung ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 42-43° C inkubiert.

Reinzüchtung der Salmonellen

Am nächsten Tag wurde von jedem Sektor auf den BGA-Platten, der mit einigermaßen verdächtigen Kolonien bewachsen war, eine solche Kolonie auf eine ebenfalls dreigeteilte modifizierte BGA-Platte überimpft und fraktioniert ausgestrichen. Auch diese Platten wurden über nacht bei 42-43° C bebrütet.

Identifizierung der Salmonellen

Am folgenden Tag wurde mittels Objektträger-Agglutination mit O-Gruppen-Seren die Gruppenzugehörigkeit der reingezüchteten Stämme festgestellt. Nicht agglutinierende Stämme wurden mit dem Oxidase-Test als Fehlisolat entlarvt oder andernfalls in einer kleinen bunten Reihe auf ihre Zugehörigkeit zum Genus Salmonella untersucht. Bei Fehlisolationen wurde auf der entsprechenden BGA-Platte nachkontrolliert, ob nicht doch noch eine Salmonellenkolonie zu finden sei.

Von jeder festgestellten O-Gruppe pro Gesamtprobe wurde ein Isolat zur Typisierung eingesandt an die Schweizerische Salmonellazentrale am Veterinär-Bakteriologischen Institut der Universität Bern.

Verarbeitung der Kontrollkulturen

Sobald die Objektträger-Agglutination abgeschlossen war, wurden die Kontrollkulturen in Tetrathionat-Bouillon umgezüchtet, mit Ausnahme derjenigen Gewichtsstufen, die definitiv vollständig positiv ausgefallen waren. Auch vollständig negativ gebliebene Gewichtsstufen wurden nicht weitergezüchtet, sofern die nächst höhere Gewichtsstufe ebenfalls vollständig negativ war.

Vorgehen bei sehr hohen Salmonellenzahlen

Wenn aus allen 24 Portionen ausnahmslos Salmonellen isoliert werden konnten, wurde der ganze Untersuchungsgang mit kleineren dekadischen Gewichtsstufen wiederholt. Ausgehend von einem Homogenat von 10 g Material und 90 g gepuffertem Peptonwasser wurden je 6 Voranreicherungen der Gewichtsstufen 0,1, 0,01, 0,001 und 0,0001 g mit Peptonwasser ad 10 ml in Röhrchen angesetzt. Im übrigen wurde gleich vorgegangen, wie oben beschrieben ist.

Auswertung der Resultate

Als positiv wurde jede der 24 Portionen gezählt, aus der wenigstens einmal Salmonellen isoliert werden konnten. Es

versteht sich von selbst, dass grösste Sorgfalt darauf verwendet wurde, dass die Portionen in jedem Verfahrensschritt eindeutig identifizierbar waren, und zwar auch innerhalb der einzelnen Gewichtsstufen. Für die gefundene Kombination positiver und negativer Teilresultate in drei aufeinanderfolgenden Gewichtsstufen wurde der Tabelle 3 der Mittelwert für die Ausgangskeimzahl entnommen. Protokolliert wurden die auf 1 kg Material bezogenen Salmonellenzahlen. Im Normalfall untersuchten wir vier aufeinanderfolgende dekadische Gewichtsstufen. Ausgewertet davon wurden die ersten drei, wenn höchstens die erste Gewichtsstufe vollständig positiv ausgefallen war, sonst die drei letzten.

Beispiel zur Anwendung von Tabelle 3

Ein Untersuchungsergebnis laute:

100 g :	6 mal	positiv
10 g :	3 mal	positiv
1 g :	1 mal	positiv
0,1 g :	0 mal	positiv

Ausgewertet werden in diesem Fall die ersten drei Gewichtsstufen mit der Kombination 6-3-1. In der entsprechenden Zeile von Tabelle 3 finden wir für den Mittelwert 1,1. Da das Gewicht einer Portion der mittleren Gewichtsstufe in unserem Beispiel 0,01 kg beträgt, erhalten wir durch Division den Mittelwert von $1,1 \cdot 10^2$ Salmonellen pro kg.

Tabelle 3: Mittelwert (Numerus* und Zehnerlogarithmus) sowie 95 %-Toleranzbereich der auf eine Portion der mittleren Gewichtsstufe bezogenen Keimzahlen bei den häufigsten Kombinationen positiver Portionen

Kombination	Mittelwert num	log	95%-Toleranzbereich
0-0-0	<0,015	<-1,82	- 0,015
0-0-1	0,015	-1,82	0,015 - 0,015
0-1-0	0,015	-1,82	0,015 - 0,015
0-1-1	0,030	-1,52	0,030 - 0,030
0-2-0	0,031	-1,51	0,030 - 0,030
1-0-0	0,018	-1,75	0,015 - 0,030
1-0-1	0,034	-1,47	0,030 - 0,045
1-1-0	0,035	-1,46	0,030 - 0,045
1-1-1	0,051	-1,29	0,045 - 0,075
1-2-0	0,052	-1,29	0,045 - 0,075
1-3-0	0,069	-1,16	0,060 - 0,090
2-0-0	0,039	-1,41	0,030 - 0,060
2-0-1	0,058	-1,24	0,045 - 0,090
2-1-0	0,058	-1,23	0,045 - 0,090
2-1-1	0,077	-1,11	0,060 - 0,120
2-2-0	0,078	-1,11	0,060 - 0,120
2-2-1	0,097	-1,01	0,075 - 0,135
2-3-0	0,098	-1,01	0,075 - 0,135
3-0-0	0,066	-1,18	0,045 - 0,105
3-0-1	0,088	-1,06	0,060 - 0,135
3-0-2	0,11	-0,96	0,08 - 0,17
3-1-0	0,089	-1,05	0,060 - 0,135
3-1-1	0,11	-0,95	0,08 - 0,17
3-2-0	0,11	-0,95	0,08 - 0,18

* Berechnung siehe Anhang, Seite 57

Tabelle 3: Fortsetzung

Kombination	Mittelwert num	log	95%-Toleranzbereich
3-2-1	0,14	-0,87	0,09 - 0,21
3-3-0	0,14	-0,86	0,09 - 0,21
3-3-1	0,16	-0,79	0,11 - 0,24
3-4-0	0,16	-0,79	0,11 - 0,24
4-0-0	0,10	-0,98	0,06 - 0,18
4-0-1	0,13	-0,88	0,08 - 0,21
4-0-2	0,16	-0,80	0,09 - 0,26
4-1-0	0,13	-0,88	0,08 - 0,21
4-1-1	0,16	-0,79	0,09 - 0,26
4-1-2	0,19	-0,72	0,11 - 0,30
4-2-0	0,16	-0,79	0,09 - 0,26
4-2-1	0,19	-0,71	0,11 - 0,30
4-2-2	0,22	-0,65	0,12 - 0,35
4-3-0	0,20	-0,71	0,11 - 0,30
4-3-1	0,23	-0,64	0,14 - 0,36
4-4-0	0,23	-0,63	0,14 - 0,38
4-4-1	0,27	-0,58	0,15 - 0,41
4-5-0	0,27	-0,57	0,15 - 0,42
5-0-0	0,16	-0,78	0,08 - 0,29
5-0-1	0,20	-0,69	0,09 - 0,35
5-0-2	0,24	-0,61	0,12 - 0,42
5-1-0	0,21	-0,68	0,09 - 0,36
5-1-1	0,25	-0,60	0,12 - 0,44
5-1-2	0,30	-0,53	0,14 - 0,50
5-2-0	0,26	-0,59	0,12 - 0,44
5-2-1	0,30	-0,52	0,14 - 0,51
5-2-2	0,35	-0,45	0,17 - 0,59
5-3-0	0,31	-0,51	0,14 - 0,53

Tabelle 3: Fortsetzung

Kombination	Mittelwert		95%-Toleranzbereich
	num	log	
5-3-1	0,36	-0,44	0,17 - 0,60
5-3-2	0,42	-0,38	0,20 - 0,69
5-4-0	0,37	-0,43	0,17 - 0,63
5-4-1	0,43	-0,36	0,20 - 0,71
5-4-2	0,50	-0,30	0,24 - 0,81
5-5-0	0,45	-0,35	0,21 - 0,75
5-5-1	0,51	-0,29	0,24 - 0,84
5-6-0	0,53	-0,27	0,24 - 0,87
6-0-0	0,32	-0,50	0,11 - 0,63
6-0-1	0,41	-0,39	0,14 - 0,81
6-0-2	0,52	-0,29	0,17 - 0,99
6-1-0	0,43	-0,36	0,14 - 0,87
6-1-1	0,55	-0,26	0,17 - 1,08
6-1-2	0,70	-0,16	0,21 - 1,31
6-1-3	0,86	-0,07	0,27 - 1,56
6-2-0	0,60	-0,22	0,17 - 1,17
6-2-1	0,76	-0,12	0,23 - 1,46
6-2-2	0,94	-0,03	0,29 - 1,74
6-2-3	1,1	0,06	0,4 - 2,0
6-3-0	0,84	-0,08	0,23 - 1,62
6-3-1	1,1	0,02	0,3 - 2,0
6-3-2	1,3	0,11	0,4 - 2,3
6-3-3	1,5	0,19	0,5 - 2,7
6-3-4	1,8	0,25	0,7 - 3,1
6-4-0	1,2	0,08	0,3 - 2,3
6-4-1	1,5	0,17	0,4 - 2,7
6-4-2	1,8	0,26	0,6 - 3,2
6-4-3	2,1	0,33	0,8 - 3,7

Tabelle 3: Schluss

Kombination	Mittelwert num	log	95%-Toleranzbereich
6-4-4	2,5	0,40	0,9 - 4,3
6-4-5	2,9	0,46	1,2 - 4,9
6-5-0	1,8	0,26	0,5 - 3,5
6-5-1	2,3	0,35	0,7 - 4,2
6-5-2	2,8	0,44	0,9 - 5,0
6-5-3	3,3	0,52	1,1 - 6,0
6-5-4	4,0	0,60	1,4 - 7,1
6-5-5	4,8	0,68	1,8 - 8,3
6-5-6	5,7	0,76	2,2 - 9,7
6-6-0	3,5	0,54	0,8 - 7,2
6-6-1	4,8	0,68	1,1 - 9,9
6-6-2	6,8	0,83	1,5 - 13,7
6-6-3	9,7	0,99	2,2 - 19,3
6-6-4	15	1,16	3 - 28
6-6-5	24	1,39	5 - 49
6-6-6	> 22	> 1,35	9 -

5. Resultate

Grundsätzlich haben wir, wenn von einer Kläranlage mehrere Proben desselben Materials untersucht wurden, das arithmetische Mittel der Einzelresultate für die weitere Auswertung verwendet. So ist z.B. der bei den Salmonellen im Abgabeschlamm (Tabelle 4) aufgeführte Maximalwert von $2,4 \cdot 10^6$ das Mittel von $1,9 \cdot 10^2$ und $4,8 \cdot 10^6$ Salmonellen/kg. Im übrigen möchten wir noch besonders darauf hinweisen, dass die Gesamtkeim- und Enterobakteriazeenzahlen pro Gramm Material angegeben sind, die Salmonellenzahlen aber pro Kilogramm.

5.1. Klärschlamm

Tabelle 4: Der Keimgehalt im Abgabeschlamm

untersuchte Proben:	370 von 207 Anlagen	
Gesamtkeimzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$9,1 \cdot 10^8$
	90%-Bereich:	$9,3 \cdot 10^5 - 2,7 \cdot 10^8$
	Medianwert:	$1,1 \cdot 10^7$
Enterobakteriazeenzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$2,2 \cdot 10^8$
	90%-Bereich:	$3,0 \cdot 10^3 - 1,7 \cdot 10^7$
	Medianwert:	$1,3 \cdot 10^5$
Salmonellenzahl (kg^{-1})	Maximalwert:	$2,4 \cdot 10^6$
	90%-Bereich:	$1,0 \cdot 10^1 - 8,1 \cdot 10^4$
	Medianwert:	$7,8 \cdot 10^2$

Bei den in Tabelle 4 zusammengestellten Keimzahlen im Abgabeschlamm fällt besonders die grosse Streubreite auf. Von 2 Kläranlagen, die nur je einmal besucht wurden, waren die Schlammproben in 666,6 g Salmonellen-negativ. Bei 6 weiteren Kläranlagen fanden wir positive und negative Proben, bei den restlichen 199 Anlagen konnten wir ausnahmslos immer Salmonellen im Schlamm nachweisen.

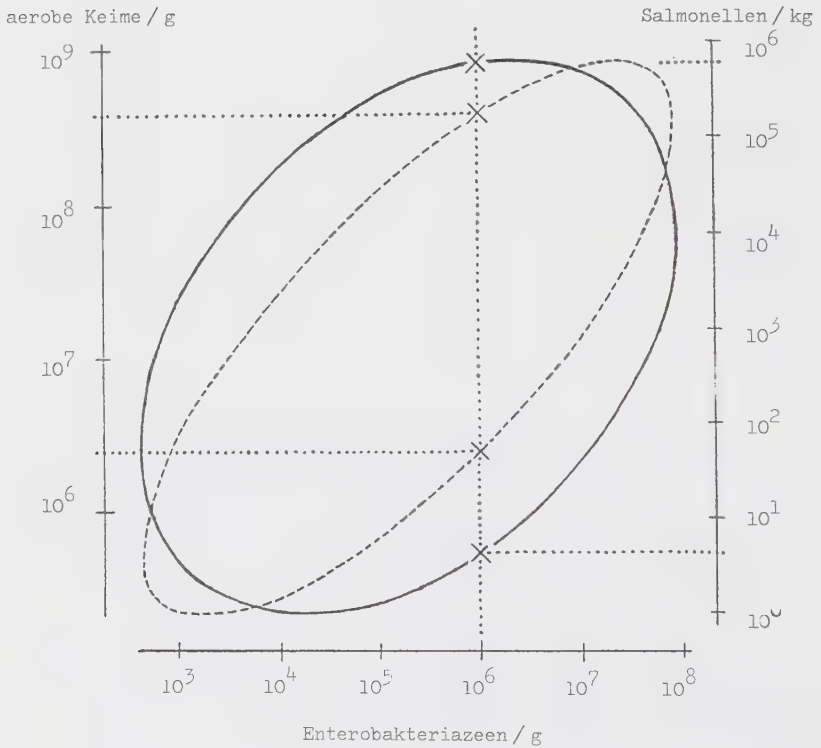
Zwischen den Konzentrationen von aeroben Keimen und Enterobakteriazeen im Schlamm besteht eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,78$); wenig ausgeprägt ist hingegen der Zusammenhang zwischen Enterobakteriazeen- und Salmonellenzahlen mit einem Korrelationskoeffizienten von nur 0,40 (Abbildung 2).

Die aerobe Gesamtkeimzahl und die Zahl der Enterobakteriazeen spiegeln die Art und Dauer der Schlammaufbereitung in dem Sinne, dass bei längerer und intensiverer Stabilisierung beide Zahlen abnehmen. Abnorme Zahlen konnten von den Klärmeistern oft begründet werden, z. B. einmal sehr hohe durch das Beimischen von Frischschlamm und einmal sehr niedrige infolge Einfrierens des Schlammes.

Der Streubereich der Salmonellenzahlen ist durch die Gegebenheiten der Schlammaufbereitung nur nach oben limitiert (Abbildung 3). Die Salmonellenkonzentrationen im Abgabeschlamm sind in erster Linie von der zufälligen Belastung des Rohabwassers abhängig und lassen keinen Schluss auf die Bakterienabtötung im Verlaufe der Schlammstabilisierung zu.

Abbildung 2: 95%-Toleranzellipsen

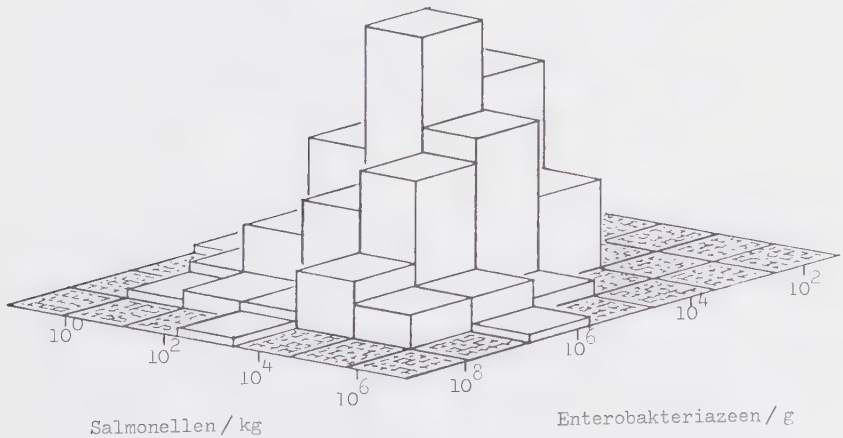
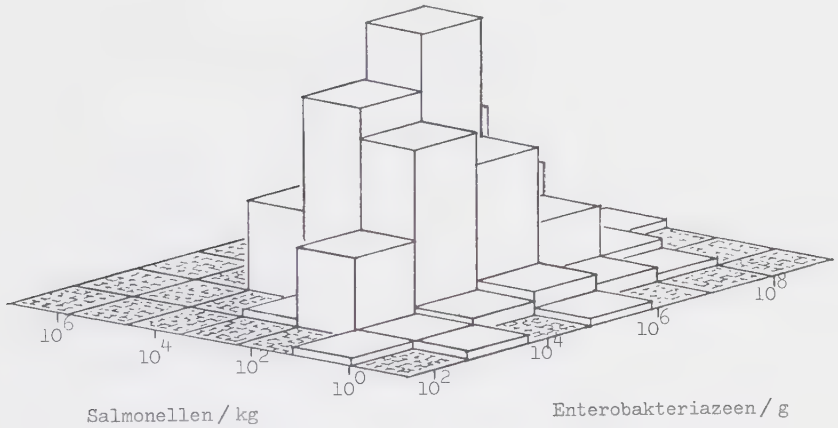
- für aerobe Keime und Enterobakteriazeen ($r = 0,78$)
 ————— für Salmonellen und Enterobakteriazeen ($r = 0,40$)



Als Beispiel ist angedeutet, dass man bei einem Schlamm, der $1 \cdot 10^6$ Enterobakteriazeen/g enthält, mit $3 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^8$ aeroben Keimen/g und mit $5 \cdot 10^0$ bis $5 \cdot 10^5$ Salmonellen/kg rechnen muss.

Abbildung 3: Verteilung der Datenpaare Enterobakteriazeen-Salmonellen
im Klärschlamm

Darstellung des Histogrammes von zwei Seiten,
Klassenbreite = 1 logarithmische Standardabweichung



Die Darstellung zeigt, dass Kombinationen "niedrige Enterobakteriazeen-
zahlen - hohe Salmonellenzahlen" nicht vorkommen.

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten zwischen Keimzahlen und Einwohnergleichwerten

Keimgruppe	r
aerobe Keime	-0,25
Enterobakteriazeen	-0,27
Salmonellen	+0,13

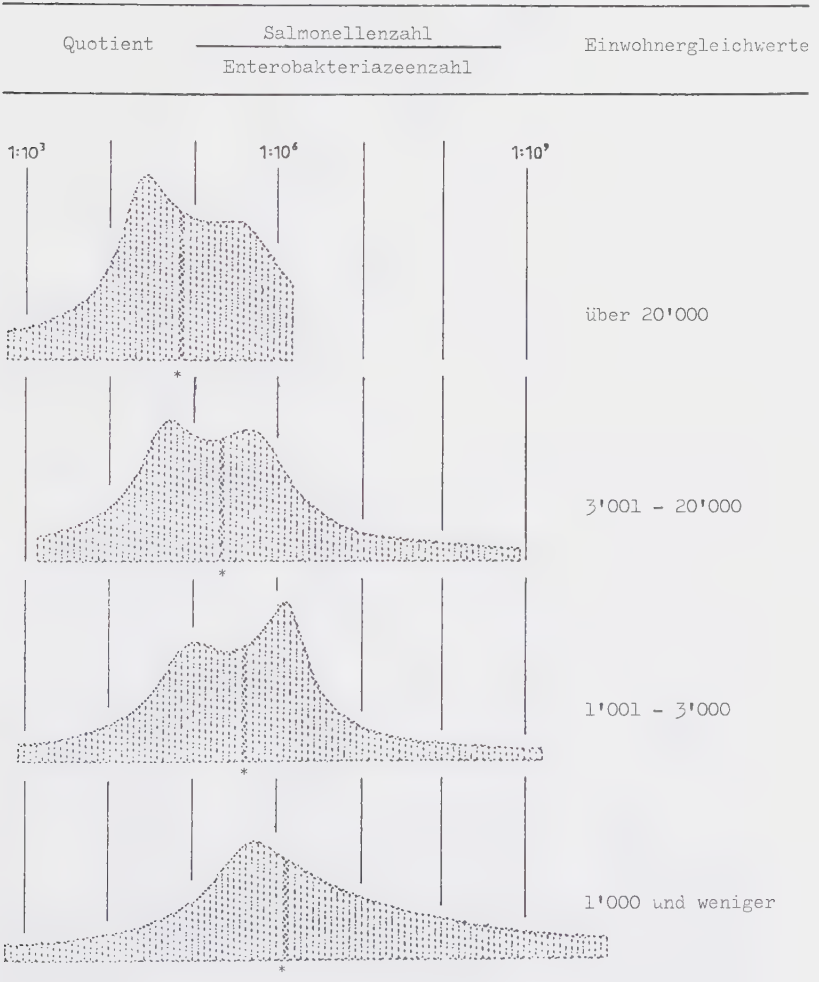
Bemerkenswert sind auch die Beziehungen zwischen den Keimzahlen im Abgabeschlamm und der Grösse der Kläranlagen (Tabelle 5). Die Gesamtkeim- und Enterobakteriazeenzahlen nehmen mit der Kläranlagengrösse ab, bei den Salmonellen hingegen fanden wir eine nicht signifikante ($p > 0,05$), d. h. zufällige oder geringgradige Zunahme. Der relative Anteil der Salmonellen an den Gesamtenterobakteriazeen nimmt mit der Anlagengrösse zu (Korrelationskoeffizient $r = +0,35$). Tabelle 6 und Abbildung 4 informieren über das zahlenmässige Verhältnis zwischen Salmonellen und übrigen Enterobakteriazeen bei den einzelnen Grössenklassen der Kläranlagen.

Tabelle 6: Das Zahlenverhältnis zwischen Salmonellen und Enterobakteriazeen im Schlamm verschieden grosser Kläranlagen

Einwohnergleichwerte	n	Salmonellenzahl : Enterobakteriazeenzahl	
		Median	90%-Bereich
über 20'000	49	$1 : 5 \cdot 10^4$	$1 : 2 \cdot 10^3 - 1 : 8 \cdot 10^5$
3'001 - 20'000	93	$1 : 2 \cdot 10^5$	$1 : 5 \cdot 10^3 - 1 : 6 \cdot 10^7$
1'001 - 3'000	42	$1 : 4 \cdot 10^5$	$1 : 5 \cdot 10^3 - 1 : 9 \cdot 10^7$
1'000 und weniger	21	$1 : 1 \cdot 10^6$	$1 : 5 \cdot 10^3 - 1 : 2 \cdot 10^9$

Abbildung 4:

Die Verteilung der Quotienten Salmonellenzahl/Enterobakteriazeenzahl im Schlamm verschieden grosser Kläranlagen



* Die fette Linie markiert die Lage des Medians.

Tabelle 7: Langzeitüberwachung des Abgabeschlammes einer grösseren Kläranlage (25'000 Einwohnerggleichwerte)

Datum	Gesamt- keimzahl ($10^6 \cdot g^{-1}$)	Enterobakte- riazeenzahl ($10^4 \cdot g^{-1}$)	Salmonellen- zahl ($10^3 \cdot kg^{-1}$)
14. 8.80	5,3	6,5	3,3
20. 8.80	2,6	10	2,8
26. 8.80	8,6	7,3	18
10. 9.80	2,4	5,5	0,10
16. 9.80	4,6	5,8	0,13
30. 9.80	0,64	1,4	0,26
7.10.80	5,0	1,8	0,26
20.10.80	0,95	27	2,6
29.10.80	50	7,7	4,8
12.11.80	26	34	0,83
25.11.80	58	28	8,4
20. 1.81	30	16	8,4
10. 2.81	12	320	350
6. 4.81	7,0	15	0,84
16. 8.81	27	72	2,9
26. 8.81	3,5	5,2	8,4
1. 9.81	2,3	3,8	6,0
8. 9.81	1,9	2,4	5,5
15. 9.81	27	2,5	11
30. 9.81	0,23	0,47	4,1
7.10.81	0,65	1,3	35
13.10.81	2,0	2,8	8,4
20.10.81	52	41	4,3
27.10.81	27	84	6,0
3.11.81	36	69	6,0
10.11.81	41	86	1,8
17.11.81	24	29	2,3
8.12.81	4,5	42	0,60
15.12.81	26	11	4,3

Tabelle 8: Schlüssel zur vergleichenden Beurteilung bakteriologischer Resultate beim Klärschlamm

Vergleichsprädikat für die Höhe der Keimzahl	Umfang der Kategorien		
	Gesamtkeimzahl (g ⁻¹)	Enterobakteriäsenz (g ⁻¹)	Salmonellenzahl (kg ⁻¹)
sehr niedrig	- 3,5·10 ⁶	- 2,9·10 ⁴	- 7,0·10 ¹
niedrig	3,6·10 ⁶ - 6,6·10 ⁶	3,0·10 ⁴ - 7,1·10 ⁴	7,1·10 ¹ - 3,2·10 ²
durchschnittlich	6,7·10 ⁶ - 1,8·10 ⁷	7,2·10 ⁴ - 2,7·10 ⁵	3,3·10 ² - 1,7·10 ³
hoch	1,9·10 ⁷ - 5,4·10 ⁷	2,8·10 ⁵ - 1,7·10 ⁶	1,8·10 ³ - 7,0·10 ³
sehr hoch	5,5·10 ⁷ -	1,8·10 ⁶ -	7,1·10 ³ -

Die Kategoriengrenzen wurden so festgesetzt, dass sich in jeder Kategorie je ein Fünftel der untersuchten Kläranlagen befindet.

Die Resultate der Langzeitüberwachung des Abgabeschlammes einer grösseren Kläranlage (Tabelle 7) illustrieren die starken Schwankungen der Keimzahlen, und zwar insbesondere bei den Salmonellen. Ihre Zahl schwankte zwischen $1,0 \cdot 10^2$ und $3,5 \cdot 10^5$. Auch wenn, wie dieses Beispiel zeigt, Einzeluntersuchungen nicht zu repräsentativen Resultaten führen können, mussten wir unsere Ergebnisse den Klärmeistern auf Verlangen doch mitteilen.

Da Keimzahlen ohne Vergleichswerte nicht zu interpretieren sind, haben wir die Befunde jeweils mit "Noten" versehen. Die "Noten" gaben an, in welches Fünftel der laufend nachgeführten Rangliste ein Resultat sich einordnete. Die letzte Bewertungstabelle entspricht Tabelle 8. Diese Tabelle gibt gleichzeitig einen Ueberblick über die Verteilung der Keimzahlen im Schlamm aller untersuchten 207 Kläranlagen.

5.2. Abwasser

Beim Rohabwasser (Tabelle 9) fällt der im Vergleich zum Klärschlamm enge Streubereich bei den Gesamtkeim- und Enterobakteriazeenzahlen auf. 4 Rohabwasserproben (14%) waren in 2,5 kg Salmonellen-negativ. Es ist damit zu rechnen, dass die Salmonellen im Kläranlagen-Zulauf schubweise angeflutet werden.

Beim gereinigten Abwasser (Tabelle 10) fallen die hohen Keimzahlen auf. Bei einem Drittel der Kläranlagen fanden wir in 666,6 g gereinigtem Abwasser keine Salmonellen. Das

Probenvolumen von 2/3 Litern war gerade ausreichend, um die Salmonellenzahlen im Bereich des Medians nachzuweisen.

Tabelle 9: Der Keimgehalt im Rohabwasser (aus Kläranlagen-Zulauf)

untersuchte Proben:	29 von 29 Anlagen	
Gesamtkeimzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$1,1 \cdot 10^7$
	90%-Bereich:	$5,5 \cdot 10^5 - 9,1 \cdot 10^6$
	Medianwert:	$2,5 \cdot 10^6$
Enterobakteriazeenzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$6,4 \cdot 10^5$
	90%-Bereich:	$2,5 \cdot 10^4 - 6,1 \cdot 10^5$
	Medianwert:	$1,4 \cdot 10^5$

Tabelle 10: Der Keimgehalt im gereinigten Abwasser (Kläranlagen-Effluent oder Brauchwasser)

untersuchte Proben:	150 von 140 Anlagen	
Gesamtkeimzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$1,3 \cdot 10^7$
	90%-Bereich:	$1,0 \cdot 10^4 - 2,7 \cdot 10^6$
	Medianwert:	$9,3 \cdot 10^4$
Enterobakteriazeenzahl (g^{-1})	Maximalwert:	$1,0 \cdot 10^6$
	90%-Bereich:	$5,0 \cdot 10^2 - 1,8 \cdot 10^5$
	Medianwert:	$7,2 \cdot 10^3$
Salmonellenzahl (kg^{-1})	Maximalwert:	$4,8 \cdot 10^4$
	90%-Bereich:	$< 1,5 \cdot 10^0 - 9,7 \cdot 10^2$
	Medianwert:	$1,8 \cdot 10^0$

Tabelle 11: Aus der Luft sedimentierende Bakterien pro m² und Tag (d) in der Umgebung verschiedener Streuherde

Lage der Messpunkte bzw. Distanz vom Streuherd	Art des Streuherdes			
	Abwasserbelüftung mit Turbine	Feinblasige Abwasserbelüftung	Feinblasige Abwasserbelüftung mit Sprühwasser	Tropfkörper
				Nachklärbecken mit Sprühwasserberieselung
			Gesamtkeimzahl (10 ⁶ · m ⁻² · d ⁻¹)	
Zentrum	60	9	30	---
0 m (Rand)	50	4	6	5
10 m	7	2	0,4	0,1
20 m	2	1	0,2	0,1
30 m	0,7	0,7	0,1	0,1
40 m	0,3	0,6	0,03	0,04
60 m	0,09	0,3	0,03	0,1
				0,4 0,2 0,03 0,03 0,02 0,02 0,03
			Enterobakteriaseenzahl (10 ³ · m ⁻² · d ⁻¹)	
Zentrum	700	80	800	---
0 m (Rand)	500	50	100	100
10 m	80	20	6	0,3
20 m	20	10	2	0,2
30 m	6	9	1	0,1
40 m	2	8	0,4	0,04
60 m	0,3	5	1	0,3
				30 10 0,5 0,1 0,05 0,04 0,5

Tabelle 12: Aus der Luft sedimentierende Bakterien pro m^2 und Tag (d)
am Rande von mehr oder weniger punktförmigen Streuherden

Streuherd	Gesamtkeimzahl	Enterobakteriazeenzahl
	$(10^7 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1})$	$(10^5 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1})$
Förderschnecke zwischen Vor- klär- und Belüftungsbecken	20	50
Schlammbelüftung	1	0,7
Belüfteter Sandfang	0,2	0,3

5.3. Luft

In unserem Zusammenhang interessierten ausschliesslich die aus der Luft sedimentierenden Keime, und zwar als mögliche Rekontaminanten für hygienisierten Klärschlamm. Keimquellen par excellence sind die Einrichtungen, die Abwasser versprühen, wie namentlich Belüftungs- und Berieselungsanlagen. Auf kurze Distanz werden grosse Keimmengen mit Spritzern und grösseren Tröpfchen transportiert, besonders bei der Abwasserbelüftung mit Turbine. Ausserhalb der Spritzwasserzone stellten wir eine rapide Abnahme der Keimzahlen mit dem Abstand vom Streuherd fest. Neben grossen Streuherden (Tabelle 11) fanden wir kleinere (Tabelle 12). Die Keimemission der kleinen Quellen geht ausserhalb ihrer unmittelbaren Umgebung in der Emission der grossen Streuherde unter.

6. Diskussion

6.1. Kommentar zur Salmonellen-Nachweismethode

Die verwendete Methode ist im wesentlichen die von Edel und Kampelmacher (10-13) aufgebaute Standardmethode, deren Vorzüge in einer grossangelegten vergleichenden Untersuchung bewiesen wurden. Unsere hauptsächlichste Modifikation bestand in der Verlängerung der Voranreicherungsdauer bei gleichzeitiger Herabsetzung der Bebrütungstemperatur. Kleinere Aenderungen reduzierten den Materialverbrauch: bei der Tetrathionat-Bouillon kamen wir mit weniger als 20 % aus, beim Agar mit weniger als 50 %.

"Human factor"

Eine dritte Gruppe von Aenderungen betraf einen besonders wichtigen Punkt. Edel (9) schliesst seine grundlegende Arbeit mit diesem Wunsch: "It is hoped that in future comparative studies in the field of microbiology, besides standardization of methodology also the 'human factor' will be taken in consideration." Unter "human factor" versteht er dabei wie schon Kampelmacher (18) in erster Linie die Erfahrung und den persönlichen Einsatz beim Untersuchen von möglichst vielen irgendwie verdächtigen Kolonien auf den Selektivplatten. Es ist menschlich, dass bei grossem Arbeitsanfall im Routinebetrieb die Aufwendigkeit der gebräuchlichen Keimdifferenzierungsmethoden dazu verleitet, manche fragliche Kolonie nicht weiter zu untersuchen.

Durch eine Reihe von an sich kleinen Verbesserungen bei den der Isolierung vorangehenden Schritten erreichten wir, dass das Koloniewachstum der Salmonellen auf den Selektivplatten praktisch einem Alles-oder-Nichts-Gesetz gehorchte. Das Bestätigungsverfahren konnten wir deshalb rigoros einschränken und auf die Untersuchung einer einzigen Stichprobe reduzieren. Da wir grundsätzlich Reinkulturen für die weitere Untersuchung verwendeten, bestand die Arbeit beim Ablesen der Selektivplatten nur noch darin, von jedem vermutlich positiven Sektor eine Stichprobe umzuzüchten. Damit war der Entscheid auch schon um 24 Stunden hinausgeschoben. Bei wenig typisch wachsenden Salmonellenstämmen wirkte sich der "human factor" geradezu positiv auf die Nachweisquote aus; denn es ist sehr menschlich, dass man mit zunehmender Ermüdung Entscheidungen lieber vertagt.

Die Sicherheit der Methode

Ein einziges Mal versagte unser abgekürztes Bestätigungsverfahren, so dass wir einen Proteusstamm an die Salmonellazentrale einschickten (Fehlerquote 1 Promille). Diese Fehlleistung gab Anlass, der Herstellung, Lagerung und Kontrolle der BGA-Platten vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken. Vor allem wurden seither Platten, die trotz längerem Trocknen rotstichig blieben, nicht mehr zur Selektiv- sondern nur noch zur Reinkultur verwendet. Dieses Beispiel mag zeigen, dass das abgekürzte Bestätigungsverfahren nur im Zusammenhang mit dem gesamten Aufbau der Methode brauchbar ist.

Die Kontrollkulturen brachten fast ausnahmslos die gleichen Resultate wie die Erstkulturen, allfällige Differenzen waren klein. Der Salmonellennachweis aus den Voranreicherungen war also gut reproduzierbar. Bei den rund 3'000 positiven Einzelportionen der letzten positiven Gewichtsstufen isolierten wir immer Salmonellen der gleichen O-Gruppe aus Erst- und Kontrollkultur. Dies ist ein indirekter Beweis dafür, dass wir das angestrebte Nachweisen von Einzelkeimen praktisch erreichten.

Anwendung der Methode

Wir sind der Ansicht, dass die beschriebenen kleinen, aber erfolgreichen Modifikationen der Standardmethode auch auf andere Gebiete der Salmonellendiagnostik übertragen werden können, denn spätestens nach der Voranreicherung dürfte das Herkunftsmilieu und die Vorgeschichte auf das kulturelle Verhalten der Keime keinen grossen Einfluss mehr ausüben.

6.2. Besprechung der Ergebnisse der Schlammuntersuchungen

Literatur

Der von uns gefundene Medianwert von $7,8 \cdot 10^2$ Salmonellen je Kilogramm Abgabeschlamm stimmt mit der von Hess, Lott und Breer (16) angegebenen Grössenordnung von 10^3 Salmonellen je Kilogramm überein. Im übrigen finden sich in der Literatur keine quantitativen Angaben, die auf Untersuchungen von Schlämmen einer repräsentativen Anzahl von Kläranlagen beruhen.

Kläranlagengrösse und Salmonellenzahl

Wenn wir davon ausgehen, dass die Salmonellen im Verlauf der Schlammstabilisierung im grossen ganzen proportional mit den übrigen Enterobakteriazeen abnehmen, dann ist das Zahlenverhältnis zwischen Enterobakteriazeen und Salmonellen im Schlamm ein von der Schlammzubereitung unabhängiges Mass für die Salmonellendurchseuchung im Einzugsgebiet einer Kläranlage. Es ist in epidemiologischer Hinsicht bemerkenswert, dass der relative Anteil der Salmonellen an den Enterobakteriazeen mit der Grösse der Kläranlagen zunimmt (Tabelle 6 und Abbildung 4). In grösseren Agglomerationen ist offenbar die Durchseuchungsrate mit Salmonellen höher als in kleineren Siedlungen. Der Schlamm kleinerer Anlagen enthält trotzdem im Schnitt gleichviel Salmonellen wie der von grösseren. Das liegt daran, dass beim Bau von kleineren Kläranlagen zuerst an der Ausrüstung zur Schlammzubereitung gespart wird. Der Stabilisierungsgrad des Schlamms beurteilt nach seiner Gesamtkeim- und Enterobakteriazeenzahl ist denn auch bei kleinen Anlagen schlechter als bei grossen (Tabelle 5).

Klärschlamm—Futterpflanze—Weidevieh

Die epidemiologische Bedeutung der mit dem Klärschlamm ausgebrachten Salmonellenquantitäten geht aus einer Untersuchung von Kampelmacher und van Noorle Jansen (19) hervor. Diese Autoren überwachten während einer ganzen Weideperiode die grosse Rinderherde eines Gutsbetriebes. Die Tiere wurden

ungefähr wöchentlich auf neue Weiden umgetrieben, die 8 bis 21 Tage vorher mit Faulschlamm gedüngt worden waren. Das Kilogramm Schlamm enthielt zwischen $1,7 \cdot 10^2$ und $9,2 \cdot 10^3$ Salmonellen. Aufgrund von Grasuntersuchungen schätzten die Autoren, dass die Tiere täglich zwischen 10^2 und 10^3 Salmonellen aufnahmen. In 4,4% der eingesammelten Kotproben wurden Salmonellen nachgewiesen, was bedeutend mehr war als der Durchschnitt von 0,5% Ausscheidertieren in einem vergleichbar grossen Kollektiv aus anderen niederländischen Beständen (14).

In der Schweiz fand Valette (30) 1965 unter 300 Schlachtrindern einen einzigen Salmonellenträger (0,3%), Breer (2) isolierte in den Jahren 1974-77 bei 2'515 Schlachtrindern 63 mal Salmonellen (2,5%). Diese Zunahme um ein Mehrfaches sowie der Umstand, dass im Bündnerland erst seit Einführung der Klärschlammdüngung Salmonellenträger beim Rind nachgewiesen wurden (15), sind ein indirekter Beweis für die Infektkette Schlamm-Futterpflanze-Weidevieh und ihre mit dem Fortschritt beim Gewässerschutz zunehmende epidemiologische Bedeutung.

Pro Einwohnergleichwert und Tag fällt von den Kläranlagen ein Liter Nassschlamm an. In 90% der Fälle enthält dieser Liter zwischen $1,0 \cdot 10^1$ und $8,1 \cdot 10^4$ Salmonellen (Tabelle 4). Ein Drittel der gesamten Schlammmenge wird auf Grünland ausgebracht !

Nachdem in der Schweiz für das Sammeln und Reinigen der Abwässer gegen 20 Milliarden Franken investiert worden sind, erscheint es widersinnig, dass das Abwasserkonzentrat Klärschlamm wieder weiträumig verteilt wird, ohne durch eine Entseuchung von seiner Bürde an pathogenen Organismen (Viren, Bakterien, Parasiten) befreit zu werden.

6.3. Die hygienische Qualität des Abwassers und der Luft in den Kläranlagen

Literatur

Seit Wilson (34) 1928 als erster über die Isolierung von *S. typhi* aus Abwasser und aus einer Muschel berichtete, ist eine umfangreiche Literatur über die Rolle des Abwassers als Vehikel für pathogene Organismen entstanden. Die Arbeiten über den Einfluss der Behandlung der Abwässer auf die Epidemiologie ihrer Krankheitserreger wurden zuletzt von Carrington (6) zusammengetragen und kommentiert. Unsere Ergebnisse (Tabelle 10) stimmen mit denen sämtlicher Autoren darin überein, dass gereinigtes Abwasser hygienisch nicht einwandfrei ist.

Auch die Keimverfrachtung in Aerosolen innerhalb der Kläranlagen und über ihren Zaun hinaus war Gegenstand vieler Untersuchungen. Eine Literaturübersicht bieten Hickey und Reist (17). Besonders zu erwähnen ist noch Wanner (32), der die mikrobielle Luftverschmutzung in schweizerischen Kläranlagen untersucht hat.

Rekontaminationsrisiken für hygienisierten Klärschlamm

Die schweizerische Klärschlammverordnung (1) definiert in Art. 1, Abs. 2: "Klärschlamm gilt als hygienisiert, wenn er im Zeitpunkt der Abgabe durch die Inhaber der Abwasserreinigungsanlagen nicht mehr als 100 Enterobacteriaceen je Gramm und keine ansteckungsfähigen Wurmeier enthält." Als Parameter für den bakteriologischen Hygieniezustand wurden die Enterobakteriazeen gewählt, weil eine Desinfektion unterschiedslos alle Vertreter dieser Familie vernichtet. Kommen Enterobakteriazeen dennoch in hygienisiertem Schlamm in deutlich erhöhten Zahlen vor, dann weist das hin auf:

- mangelhaftes Desinfektionsverfahren,
- Rekontamination und/oder
- Keimvermehrung nach der Entseuchung (8).

Besonders gut als Hygieneindikatoren in Kläranlagen eignen sich die Enterobakteriazeen, weil sie mit dem Rohabwasser ständig in grossen Zahlen angeflutet werden. Ausserdem sind sie ohne grossen Aufwand sicher nachweisbar. Anhand des Parameters Enterobakteriazeenzahl lässt sich das durch die untersuchten Materialien bedingte Rekontaminationsrisiko für hygienisierten Klärschlamm wie folgt beurteilen:

Im Rohabwasser bewegen sich die Enterobakteriazeenzahlen zwischen $2,5 \cdot 10^4$ und $6,1 \cdot 10^5/g$ (Tabelle 9), im stabilisierten Schlamm zwischen $3,0 \cdot 10^3$ und $1,7 \cdot 10^7/g$ (Tabelle 4). Rohes Abwasser und konventionell aufgearbeiteter Klärschlamm sind also vom Standpunkt der Hygiene betrachtet genau gleich ge-

fährlich, und es ist selbstverständlich, dass hygienisierter Klärschlamm von ihnen vollständig getrennt verarbeitet und gelagert werden muss.

Gereinigtes Abwasser wird in vielen Kläranlagen verwendet zur Reinigung von Plätzen, Fahrzeugen und Behältern, als Sperrwasser in Pumpen, zum Aufschlännen von Sedimenten in Faulräumen und als Medium in Wärmetauschern. Auch dieses Brauchwasser darf wegen seines hohen Enterobakteriazeengehaltes von $5,0 \cdot 10^2$ bis $1,8 \cdot 10^5/g$ (Tabelle 10) nicht in Kontakt mit hygienisiertem Klärschlamm kommen.

Trivial ist, dass hygienisierter Schlamm auch nicht in Kontakt kommen darf mit Luft, die Tröpfchen von verkeimtem Wasser enthält. Dagegen spielt die minimale Sedimentation von Keimen, die mit Aerosolen auf grössere Distanzen verbreitet werden, eine vergleichsweise geringe Rolle (Tabelle 11). Hygienisierter und bakteriologisch stabiler Schlamm muss deshalb nicht ängstlich vor jedem Kontakt mit der Aussenluft hermetisch abgeschirmt werden. Es genügt, den Luftkontakt im Rahmen des praktisch Realisierbaren einzuschränken. Abzuraten ist von Manipulationen, die einer Belüftung von hygienisiertem und anaerob stabilisiertem Schlamm gleichkommen, wie etwa Lagerung in flacher Schicht, Beschickung von offenen Stapelbehältern im freien Fall, Resuspendierung von Sedimenten mittels eingepresster Luft, da die bakteriostatischen Eigenschaften dieser Schlämme zum grossen Teil auf ihrem niedrigen Redoxpotential beruhen.

7. Zusammenfassung

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung der Salmonellenbelastung des Klärschlammes, der von den Abwasserreinigungsanlagen an die Landwirtschaft abgegeben wird. Die dabei angewandte Salmonellen-Nachweismethode ist ausführlich beschrieben und begründet.

Wir besuchten 207 Kläranlagen mit einer jährlichen Abgabe von 1,2 Millionen Tonnen Schlamm. Wir erhoben 370 Proben und fanden pro Kilogramm Nassschlamm im Mittel (Median) $7,8 \cdot 10^2$ Salmonellen bei einem 90%-Streubereich von $1,0 \cdot 10^1$ bis $8,1 \cdot 10^4$ Salmonellen. Von den 370 Proben waren nur 11 (3%) in 666,6 g Salmonellen-negativ. Diese Zahlen belegen, dass die Grünlanddüngung mit unhygienisiertem Klärschlamm nicht zu verantworten ist.

Im Zusammenhang mit der Einführung der Klärschlamm-Hygienisierung interessierte uns auch der hygienische Status von Rohabwasser und gereinigtem Abwasser. Im Rohabwasser fanden wir zwischen $2,5 \cdot 10^4$ und $6,1 \cdot 10^5$ Enterobakteriazeen pro Gramm, im gereinigten Abwasser zwischen $5,0 \cdot 10^2$ und $1,8 \cdot 10^5$. Daraus ergibt sich, dass Abwasser, auch gereinigtes generell vom Kontakt mit hygienisiertem Klärschlamm ausgeschlossen werden muss. Ferner fanden wir massive Keimimmissionen in der Umgebung von Belüftungs- und Berieselungsanlagen.

8. Literatur

1. ——— : Klärschlammverordnung der Schweizerischen Eidgenossenschaft vom 8. April 1981
2. Breer, C.: Freilandbiologie und Infektzyklen der Salmonellen; Arch. Tierheilk. 123, 89 (1981)
3. Breer, C. und W. Ruosch: Der quantitative Nachweis von Enterobacteriaceen im Rahmen der bakteriologischen Betriebshygienekontrolle; Fleischwirtschaft 58, 795 (1978)
4. Brentano, M.: Die Abwasserverhältnisse von Zürich; Dissertation ETH, Zürich 1934
5. Byrne, A.F., M.M. Rayman, and M.D. Schneider: Methods for the detection and estimation of numbers of Salmonella in dried eggs and other food products; Appl. Microbiol. 3, 368 (1955)
6. Carrington, E.G.: The fate of pathogenic micro-organisms during waste-water treatment and disposal; WRC Technical Report 128, Water Research Centre, Stevenage 1980
7. D'Aoust, J.Y. and C. Maishment: Preenrichment conditions for effective recovery of Salmonella in foods and feed ingredients; J. Food Protect. 42, 153 (1979)
8. Drion, E.F. and D.A.A. Mossel: The reliability of the examination of foods, processed for safety, for enteric pathogens and Enterobacteriaceae: a mathematical and ecological study; J. Hyg., Camb. 78, 301 (1977)
9. Edel, W.: Comparative studies on Salmonella isolation; Proefschrift, Utrecht 1974

10. Edel, W. and E.H. Kampelmacher: Comparative studies on Salmonella-isolation in eight European laboratories; Bull. WHO 39, 487 (1968)
11. Edel, W. and E.H. Kampelmacher: Salmonella isolation in nine European laboratories using a standardized technique; Bull. WHO 41, 297 (1969)
12. Edel, W. and E.H. Kampelmacher: Comparative studies on the isolation of 'sublethally injured' Salmonellae in nine European laboratories; Bull. WHO 48, 167 (1973)
13. Edel, W. and E.H. Kampelmacher: Comparative studies on Salmonella isolations from feeds in ten laboratories; Bull. WHO 50, 421 (1974)
14. Edel, W. en K. Schipper: Onderzoekingen over het voorkomen van Salmonellakiemen in de pensinhoud van runderen; Tijdschr. Diergeneesk. 94, 242 (1969)
15. Hess, E. und C. Breer: Die Dringlichkeit der Klärschlamm-Hygenisierung; Gas-Wasser-Abwasser 56, 385 (1976)
16. Hess, E., G. Lott und C. Breer: Klärschlamm und Freilandbiologie der Salmonellen; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 158, 446 (1974)
17. Hickey, J.L.S. and P.C. Reist: Health significance of airborne microorganisms from wastewater treatment processes. Part I: Summary of investigations; J. Wat. Pollut. Contr. Fed. 47, 2741 (1975)
18. Kampelmacher, E.H.: Vergelijkende onderzoekingen over de isolatie van Salmonella uit gehakt in 5 laboratoria; Tijdschr. Diergeneesk. 92, 355 (1967)

19. Kampelmacher, E.H. en L.M. van Noorle Jansen: Onderzoekingen over de bakteriële kontaminatie van weilanden door bemesting met uitgest slijb; H_2O 2, 418 (1974)
20. Kauffmann, F.: Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus- und Paratyphusbazillen; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 119, 148 (1930)
21. Kauffmann, F.: Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabazillen; Z. Hyg. 117, 26 (1935)
22. McCrady, M.H.: The numerical interpretation of fermentation-tube results; J. Inf. Dis. 17, 183 (1915)
23. Meier, J.: Unterschiedliche Salmonellenbelastung von Klärschlamm und Abfällen aus der Nutztierhaltung; Dissertation, Zürich 1979
24. Mossel, D.A.A., W.H.J. Mengerink, and H.H. Scholts: Use of a modified McConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae; J. Bact. 84, 381 (1962)
25. Müller, J.: Die Reinigungsanlagen der Stadt Zürich und ihre zukünftige Entwicklung; Strasse und Verkehr 23, 119 (1937)
26. Roschka, R.: Eine neue Methode zur Herstellung hochwertiger O-Immunseren der Salmonellagruppe; Klin. Med. 5, 88 (1950)
27. Roth, O.: Hygienische Betrachtungen über den Reinheitszustand der Limmat von Zürich bis Wettingen mit besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Abwässer der Stadt Zürich; Vierteljahrsschr. d. Naturf. Ges. Zürich 62, 479 (1917)

28. Seiffert, G.: Die Typhusschutz-Impfung und ihre Erfolge; Beiträge zur Klinik der Infektionskrankheiten und zur Immunitätsforschung 5, 318 (1916)
29. Spino, D.F.: Elevated-temperature technique for the isolation of Salmonella from streams; Appl. Microbiol. 14, 591 (1966)
30. Valette, H.: Porteurs et excréteurs sains de Salmonellae dans les espèces bovine et ovine; Arch. Tierheilk. 107, 456 (1965)
31. Van Schothorst, M. and F.M. van Leusden: Studies on the isolation of injured Salmonellae from foods; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 19 (1972)
32. Wanner, H.U.: Mikrobielle Verunreinigung der Luft durch Belebtschlammbecken; Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161, 46 (1975)
33. Watson, D.C. and A.P. Walker: A modification of Brilliant Green Agar for improved isolation of Salmonellae; J. Appl. Bact. 45, 195 (1978)
34. Wilson, W.J.: Isolation of B. typhosus from sewage and shellfish; Br. Med. J. 1, 1061 (1928)

9. Anhang: Die Berechnung des mittleren Keimgehaltes
beim Anreicherungsverfahren

Untersuchungsmaterial mit dem Volumen (oder Gewicht) V sei unterteilt in Portionen mit den Volumina $A, B, C, \dots$ und den entsprechenden relativen Volumenanteilen $a, b, c, \dots$. In V seien x Keime zufällig verteilt. Die Wahrscheinlichkeit P_A , dass sich alle x Keime in A aufhalten, ist

$$P_A = a^x.$$

Die Wahrscheinlichkeit $P_{A,B}$, dass sowohl A und B besetzt sind, ist

$$P_{A,B} = (a+b)^x - a^x - b^x.$$

Analog gilt für drei besetzte Portionen

$$P_{A,B,C} = (a+b+c)^x - (a+b)^x - (a+c)^x - (b+c)^x + a^x + b^x + c^x,$$

oder allgemein, wenn wir die Teilsummen mit S bezeichnen, wobei der Index die Anzahl Summanden angibt

$$P_S = S_n^x - \sum S_{n-1}^x + \sum S_{n-2}^x - \dots \pm \sum S_1^x.$$

Unter der Voraussetzung, dass alle Keimzahlen x gleich häufig vorkommen, gibt P_S als Funktion von x die Wahrscheinlichkeiten an, mit der die einzelnen Keimzahlen in

der untersuchten Kombination positiver Portionen auftreten.
Für den Mittelwert $\bar{x}$ dieser Funktion gilt:

$$\bar{x} = \sum_{x=1}^{\infty} x P_S : \sum_{x=1}^{\infty} P_S$$

$$\text{mit } \sum_{x=1}^{\infty} x P_S = \sum \frac{S_n}{(1 - S_n)^2} - \sum \frac{S_{n-1}}{(1 - S_{n-1})^2} + \dots$$

$$\text{und } \sum_{x=1}^{\infty} P_S = \sum \frac{S_n}{1 - S_n} - \sum \frac{S_{n-1}}{1 - S_{n-1}} + \dots$$

Beim Ausführen der Berechnung empfiehlt es sich, die absoluten Beträge der Portionen (A, B, C, ...) und des Gesamtvolumens (V) zu verwenden, z. B.

$$\frac{a+b}{(1-a-b)^2} = \frac{V(A+B)}{(V-A-B)^2}.$$

Diese Brüche lassen sich mit einem simplen Taschenrechner zu Dezimalbrüchen entwickeln, die genügend genau sind, um die Berechnung der Gesamtsummen und des Quotienten zu erlauben.

All denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,
danke ich herzlich, insbesondere

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. E. Hess für das Ueberlassen des Themas,

Herrn Prof.Dr. H.U. Bertschinger für das Korreferat,

allen Klärmeistern für ihr bereitwilliges Abgeben von Untersuchungsmaterial und Auskünften,

Fräulein Silvia Künzi, Christina Gysling und Ursula Leu für ihren grossen Einsatz im Labor und beim Probensammeln,

der Schweiz. Salmonellazentrale für die zusätzliche Arbeit,

dem Bundesamt für Bildung und Wissenschaft für die Finanzierung der Enquête.

Lebenslauf

Ruedi Maier von Winterthur wurde 1940 in seiner Heimatstadt geboren und besuchte hier die Schulen bis zur Matura 1959. Anschliessend studierte er in Zürich ein paar Semester Theologie und arbeitete dann auf der Post. Von 1971 bis 1976 studierte er in Zürich Veterinärmedizin und war nach dem Staatsexamen Assistent in einer Grosstierpraxis und seit 1977 am Institut für Veterinärhygiene der Universität Zürich.

